

doi:10.11751/ISSN.1002-1280.2022.08.04

# 稳定表达猪瘟病毒 E2 蛋白的 BHK 细胞系的构建

薛霜,徐松,郑成,徐丹丹,胡玉立,刘国兴,李婷婷,石宝兰,漆世华,谢红玲\*

(国药集团动物保健股份有限公司,武汉 430075)

[收稿日期] 2022-02-23 [文献标识码] A [文章编号] 1002-1280 (2022) 08-0024-05 [中图分类号] S852.65

**[摘要]** 猪瘟病毒(CSFV)的 E2 蛋白是引起猪体产生针对猪瘟保护性抗体的主要抗原,构建可稳定表达 CSFV E2 蛋白的细胞系,可为 E2 蛋白功能研究及基因工程猪瘟疫苗的研制提供物质基础。本研究将 CSFV E2 基因克隆至慢病毒表达载体,构建重组慢病毒表达质粒 pCDH-E2。将 pCDH-E2 重组质粒与慢病毒包装质粒共转染 293T 细胞,获得重组慢病毒。将该慢病毒感染 BHK-21 细胞,经嘌呤霉素抗性筛选结合有限稀释法筛选出可表达 CSFV E2 蛋白的 BHK 细胞系。Western blot 分析结果显示,所构建的重组细胞系传至第 10 代仍能稳定表达 CSFV E2 蛋白。该细胞系的建立为研制猪瘟新型重组疫苗及其生产奠定基础。

**[关键词]** 猪瘟病毒;E2 蛋白;慢病毒;BHK-21 细胞

## Construction of BHK Cell Line Stably Expressing E2 Protein of Classical Swine Fever Virus

XUE Shuang, XU Song, ZHENG Cheng, XU Dan-dan, HU Yu-li, LIU Guo-xing,  
LI Ting-ting, SHI Bao-lan, QI Shi-hua, XIE Hong-ling\*

(Sinopharm Animal Health Corporation Ltd., Wuhan 430075, China)

Corresponding author: XIE Hong-ling, E-mail: 13419546263@163.com

**Abstract:** E2 protein of classical swine fever virus (CSFV) is the main antigen that causes swine to produce protective antibodies against CSFV. Construction of cell lines that can stably express CSFV E2 protein can provide material basis for the research of E2 protein function and genetic engineering vaccine. In this study, CSFV E2 gene was cloned into lentiviral expression vector to obtain the recombinant plasmid of pCDH-E2, then the positive plasmid pCDH-E2 was transfected into 293T cells together with the packaging plasmids to get the recombinant lentivirus. BHK-21 cells were infected with the recombinant lentivirus, and screened by puromycin combined with limited dilution method to establish the cell line expressing CSFV E2 protein. Western blot analysis showed that the recombinant cell line could still express CSFV E2 protein stably in the 10th generation. This study successfully constructed a cell line which can stably express CSFV E2 protein, it laid a foundation for the

**作者简介:** 薛霜,硕士研究生,研发工程师,从事兽用生物制品研发工作。

**通讯作者:** 谢红玲。E-mail:13419546263@163.com

development and production of new recombinant classical swine fever vaccine.

**Key words:** classical swine fever virus; E2 protein; lentivirus; BHK - 21 cells

猪瘟是由猪瘟病毒(classical swine fever virus, CSFV)引起猪的一种急性、高度接触性、致死性的传染病。该病流行广泛,发病与死亡率高,一年四季猪不分年龄均可发生,给养猪业造成了严重经济损失。CSFV 属于黄病毒科瘟病毒属成员,为有囊膜的单股正链 RNA 病毒,基因组长约 12.3 kb,由中间一个大的开放阅读框(open reading frame, ORF)和两端非编码区 5' - UTR(untranslated region)及 3' - UTR 构成。ORF 编码一个由 3898 个氨基酸残基组成的多聚蛋白,并在翻译过程中或翻译后被病毒自身编码的蛋白酶和宿主细胞的蛋白水解酶加工切割成 12 种蛋白质<sup>[1-3]</sup>。其中 E2 蛋白是 CSFV 的主要结构蛋白,在 CSFV 中相对保守,是引起猪产生针对猪瘟保护性抗体的主要抗原,在猪瘟诊断和新型基因工程疫苗的研究上都起着重要作用<sup>[4-5]</sup>。

据报道,已有多种表达体系对 CSFV E2 蛋白进行了成功表达。其中原核表达系统具有表达周期快、表达量高、成本低等优势,但该系统不具有完善的蛋白翻译修饰功能,表达的 E2 蛋白与天然蛋白有差异,免疫原性较差,大部分只能用于抗体检测。CSFV E2 蛋白的真核表达系统目前主要有酵母、杆状病毒及哺乳动物细胞表达系统。其中前两种表达系统主要优点为蛋白表达量高,但存在表达量不稳定的问题,而且所表达的目的蛋白加工修饰与蛋白本身的天然结构存在差异,如糖基化水平和糖链结构的差异导致所表达蛋白的免疫原性及功能活性受到影响。而哺乳动物细胞表达系统的翻译修饰体系是最为完善的,该系统表达的重组外源蛋白最接近天然构象。目前哺乳动物细胞表达系统大多为贴壁培养细胞,在培养过程中需要加入外源血清,不仅增加了生产成本而且对下游上清中目的蛋白的纯化造成影响。本研究选用可无血清悬浮培养的 BHK - 21 细胞,并利用慢病毒包装系统,建立了能稳定表达 CSFV E2 蛋白的 BHK 细胞系,为 E2 蛋白功

能研究及基因工程猪瘟疫苗的研制提供物质基础。

## 1 材料与方法

1.1 实验材料 BHK - 21 细胞、293T 细胞、pCDH - CMV - IRES - EGFP - EF1 - Puro 质粒由国药集团动物保健股份有限公司实验室改造并保存;包装质粒 pMD2. G、psPAX2 购自北京擎科生物科技有限公司;Trans - stb13 化学感受态细胞购自北京全式金生物公司。

1.2 主要试剂 PrimeSTAR HS DNA 聚合酶、DNA 片段回收纯化试剂盒、质粒小量快速提取试剂盒、Cpo I 内切酶、Not I 内切酶、Solution I 快速连接酶均购自宝生物工程(大连)有限公司;嘌呤霉素购自北京索莱宝科技有限公司;HRP - 羊抗小鼠 IgG、DAB 显色试剂盒购自武汉博士德生物工程有限公司;CSFV E2 单抗由国药集团动物保健股份有限公司实验室制备和保存;Ni - IDA 亲和层析柱购自中科森辉微球技术(苏州)有限公司。

1.3 重组慢病毒表达载体的构建及慢病毒包装参考猪瘟病毒(C 株)基因序列,对 E2 蛋白核苷酸序列进行密码子优化,同时去除 C 端跨膜区的 34 个氨基酸,并在 5' 和 3' 端分别引入 Cpo I 和 Not I 限制性酶切位点,在 3' 端引入 6 × His 标签。优化后的 CSFV E2 基因由北京擎科生物科技有限公司合成。分别用 CpoI 和 NotI 限制性内切酶对慢病毒表达载体 pCDH - CMV - IRES - EGFP - EF1 - Puro 和合成的截短 E2 基因进行双酶切,胶回收约 1061 bp 大小的目的片段和 8720 bp 大小的载体片段,用 Solution I 连接酶进行连接,连接产物转化 Trans - stb13 感受态细胞,之后挑取阳性菌提取质粒进行双酶切和测序鉴定,获得的阳性重组质粒命名为 pCDH - E2。将构建的重组慢病毒表达质粒 pCDH - E2 与包装质粒 pMD2. G、psPAX2 共转染 293T 细胞进行慢病毒包装。

1.4 稳定表达 E2 蛋白的细胞株筛选

1.4.1 细胞感染 准备一块 6 孔细胞板,每孔接

种  $1 \times 10^5 \sim 4 \times 10^5$  对数期生长的 BHK-21 贴壁细胞,分别设置空白孔、Control 对照慢病毒孔和目的基因慢病毒孔,37 °C 培养过夜,当细胞密度在 40%~60% 时进行慢病毒感染;根据待感染细胞的 MOI 值,分别往细胞中加入适量的 Control 对照慢病毒和目的慢病毒,混匀后,放入细胞培养箱中继续培养过夜。

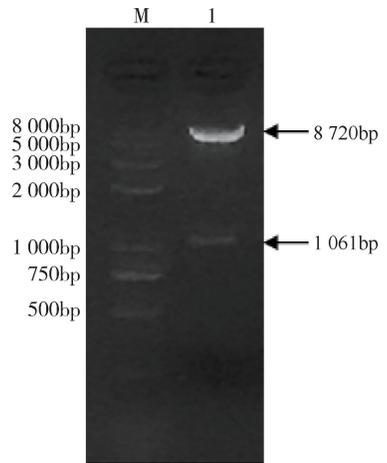
**1.4.2 稳定细胞株筛选** 12~24 h 后,给细胞更换正常的完全培养基,继续培养 48~72 h 后加入终浓度为 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的嘌呤霉素进行阳性细胞系的筛选。每 2 d 更换新的培养基(含 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的嘌呤霉素),直到培养皿中不再出现细胞死亡,同时观察绿色荧光。将药物筛选后的混合稳定克隆株消化后进行细胞计数,吸取 100 个细胞接种于 10 mL 培养基(含 10  $\mu\text{g}/\text{mL}$  的嘌呤霉素)中,吸打混合均匀后加入 96 孔细胞板中,100  $\mu\text{L}/\text{孔}$ 。3~5 d 后,在显微镜下标出只含有单个细胞克隆的有绿色荧光的细胞孔进行传代扩增。扩增到合适的细胞量后,进行无血清悬浮培养及蛋白表达,将筛选后的稳定细胞株命名为 BHK-LV-E2。

**1.4.3 E2 蛋白的表达及纯化** 将传代至第 10 代悬浮培养状态较好(活力 >90%)的 BHK-LV-E2 细胞株按  $0.6 \times 10^6/\text{mL}$  初始细胞密度,置于 37 °C 恒温摇床中进行蛋白表达,每天观察细胞状态并取样,将 CSFV E2 单抗以 1:500 倍稀释作为一抗,辣根过氧化物酶标记的山羊抗小鼠 IgG 抗体 1:1500 倍稀释作为二抗,Western Blot 分析 E2 蛋白的表达情况。收获第 7 天的表达样品,离心取上清进行 Ni 柱纯化,收集纯化过程各阶段样品进行 SDS-PAGE 检测分析。

## 2 结果与分析

**2.1 重组慢病毒表达载体的鉴定** 构建的重组慢病毒表达质粒 pCDH-E2 经 *Cpo* I 和 *Not* I 双酶切鉴定显示,可酶切出一条约 1061 bp 大小的目的片段和一条约 8720 bp 大小的载体片段(图 1),同时测序结果也显示合成的 E2 基因片段已正确插入表达载体中。

**2.2 稳定表达 CSFV E2 蛋白的细胞株筛选** 表达



1: 重组质粒 pCDH-E2 的 *Cpo* I/*Not* I 双酶切产物;

M: DNA 分子量标准

1: Enzyme digestion products of pCDH-E2 plasmid by

*Cpo* I/*Not* I; M: DNA Marker

图 1 重组质粒 pCDH-E2 酶切鉴定结果

Fig 1 Identification of recombinant pCDH-E2 plasmid by restriction enzyme digestion

质粒与包装质粒共转染 293T 细胞后,获得重组慢病毒 LV-E2。LV-E2 感染 BHK-21 细胞后采用嘌呤霉素抗性筛选结合有限稀释法挑取单细胞克隆进行稳定细胞株的筛选。结果显示,筛选后的细胞形态正常,由于 pCDH-CMV-IRES-EGFP-EF1-Puro 质粒携带绿色荧光蛋白基因 EGFP,因此在倒置荧光显微镜下细胞显示绿色荧光(图 2)。将筛选后获得的阳性克隆进行悬浮扩大培养,取第 10 代悬浮培养的阳性细胞克隆株进行蛋白表达稳定性鉴定,Western blot 分析结果显示所构建的 BHK-LV-E2 细胞传至第 10 代仍能稳定表达 CSFV E2 蛋白(图 3)。使用镍离子亲和层析柱对表达的 E2 蛋白进行纯化,结果显示当洗脱缓冲液中咪唑浓度为 500 mmol/L 时,可得到较为理想的纯化蛋白条带,且纯化后的蛋白纯度可达到 90% 以上(图 4)。

## 3 讨论与结论

近年来各种病原变异新毒株层出不穷,猪场所使用的疫苗毒株也种类繁多,减毒疫苗和灭活疫苗混用,造成猪场的疫病防控现状非常复杂。特别是某些已经感染其他病原的猪场免疫减毒活疫苗的

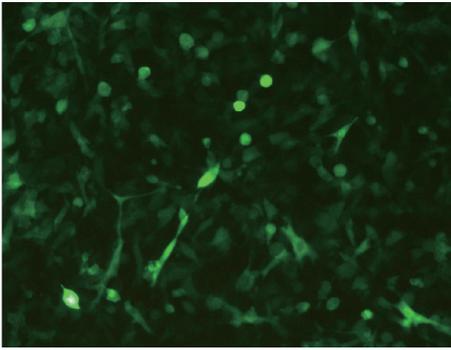
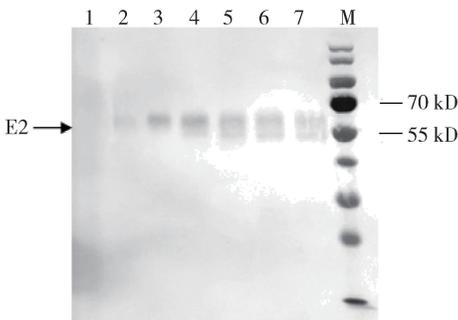


图 2 筛选后的阳性细胞荧光观察结果 (100 ×)

Fig 2 Fluorescence observation results of positive cells (100 ×)



1~7: 分别为 BHK-LV-E2 细胞表达 1~7 d 样品;

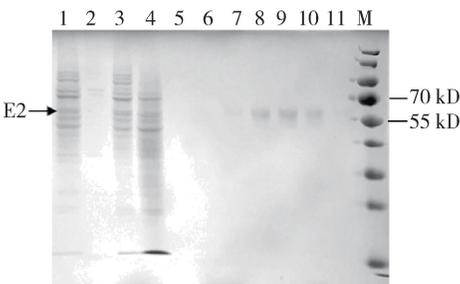
M: 蛋白质分子量标准

1~7: Samples of BHK-LV-E2 cells expressed for

1~7 days; M: Protein Marker

图 3 E2 蛋白在 BHK-LV-E2 细胞中的表达检测

Fig 3 Detection of E2 protein expressed in BHK-LV-E2 cells by Western blot



1: 表达样品原液; 2: 流穿液; 3~5: 洗杂液;

6~11: 目的蛋白洗脱液; M: 蛋白质分子量标准

1: Original liquid of expression sample; 2: Flow through liquid;

3~5: Wash liquid; 6~11: Purified E2 proteins; M: Protein Marker

图 4 E2 蛋白纯化产物的检测分析

Fig 4 SDS-PAGE analysis of the purified products of E2 protein

时候可能出现多种病原相互协同、相互促进的现象,反而造成猪场疫病的爆发。对于 CSFV,传统的猪瘟减毒活疫苗 C 株的保护效果有目共睹,但是基于目前猪场复杂的防疫现状,更为安全的猪瘟灭活疫苗将能更好地满足目前的疫病防控需求。亚单位疫苗是病毒粒子的一部分,不含有核酸,具有安全性好、稳定性强和无需灭活的优点。E2 蛋白是 CSFV 上最主要的抗原蛋白,能够诱导中和抗体的产生,具有良好的免疫原性,可制成标记性疫苗通过抗体检测区分疫苗免疫猪及野毒感染猪,用于猪场净化评估。因此 E2 蛋白是研制 CSFV 新型重组疫苗和抗体检出方法的重要候选抗原<sup>[6-7]</sup>。获得高纯度的 E2 蛋白是研制 E2 亚单位疫苗的重要基础。相对于原核表达系统而言,哺乳动物细胞具有翻译后加工与修饰表达蛋白的能力,表达出的蛋白更接近于病毒天然抗原蛋白结构,且通常可分泌于细胞上清中,有利于目的蛋白的纯化<sup>[8]</sup>。目前,构建稳定表达外源蛋白的细胞系的方法常用的有慢病毒感染与真核表达质粒的转染。相较于质粒转染目的细胞的方法,慢病毒表达系统具有构建周期短和高效的表达特性<sup>[9-10]</sup>。

CSFV E2 蛋白属于跨膜蛋白,为使 E2 蛋白能够可溶性的表达于细胞上清中并利于蛋白的进一步纯化,本研究将编码 E2 蛋白跨膜区的基因删除后引入了 His 纯化标签。并且本研究使用的 pCDH-CMV-IRES-EGFP-EF1-Puro 质粒是经本实验室改造优化后的一种慢病毒载体质粒,可实现目的基因和筛选标记基因共用一个启动子高效表达,提高多基因稳定共表达细胞株的筛选效率。因此,通过对绿色荧光的观察即可评估细胞的抗性筛选效果,并且可以使用流式细胞分选仪将绿色荧光强的细胞分选富集起来,这样大大加快了筛选高表达目的蛋白单克隆细胞的速度。此外,构建的重组慢病毒表达质粒 pCDH-E2 含有经真核细胞偏爱性密码子优化的编码 CSFV E2 蛋白的基因,且在 E2 基因上游加入了信号肽促进 E2 蛋白的分泌表达。研究结果显示,经抗性筛选结合有限稀释法挑取单细胞克隆进行多轮筛选后,在荧光显微镜下观

察,所有细胞都显示绿色荧光,表明成功筛选出阴性单克隆细胞。本研究选用了适合无血清悬浮培养的 BHK-21 细胞作为表达细胞,该细胞生长繁殖速度较快,特别适合大规模工业化生产,且表达的 E2 蛋白是分泌在细胞上清中的,均为加工成熟的蛋白,免疫原性更好。使用无血清的培养基进行悬浮培养,在能够大批量获得 E2 蛋白的同时可避免蛋白纯化时的血清干扰,从而提高蛋白纯度,节约生产成本。Western blot 检测第 10 代细胞的表达,结果显示 E2 基因已经整合到宿主细胞的基因组中。应用镍离子亲和层析柱对表达的 E2 重组蛋白进行了纯化,纯度可达 90% 以上。本研究成功构建了可稳定表达 CSFV E2 蛋白的 BHK-LV-E2 细胞系,该细胞系表达的 E2 抗原易于纯化,为深入探讨 CSFV E2 蛋白的生物学特性和 CSFV 基因工程疫苗研制提供了物质基础。

#### 参考文献:

- [1] Meyers G, Thiel H J. Molecular characterization of pestiviruses [J]. *Adv Virus Res*, 1996, 47: 53-118.
- [2] 田宏,刘湘涛,张彦明,等. 猪瘟病毒及其致病机制研究进展[J]. *动物医学进展*, 2007, 28(增): 27-30.
- Tian H, Liu X T, Zhang Y M, *et al.* Progress in classical swine fever virus and its nosogenetic mechanism [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2007, 28(Sup): 27-30.
- [3] 刘坤,兰邹然,姜平. 猪瘟病毒分子生物学及检测技术研究进展[J]. *动物医学进展*, 2012, 33(10): 99-104.
- Liu K, Lan Z R, Jiang P. Progress on molecular biology and diagnostic technique of classical swine fever virus [J]. *Progress in Veterinary Medicine*, 2012, 33(10): 99-104.
- [4] 侯强,彭伍平,孙元,等. 猪瘟病毒 E2 蛋白主要抗原区编码基因的原核表达及其单克隆抗体的制备[J]. *中国兽医学*, 2008, 38(1): 1-5.
- Hou Q, Peng W P, Sun Y, *et al.* Expression of the truncated E2 protein - encoding gene of classical swine fever virus in

*Escherichia coli* and preparation of a monoclonal antibody against E2 protein [J]. *Chinese Veterinary Science*, 2008, 38(1): 1-5.

- [5] Schroeder S, Von R T, Blome S, *et al.* Evaluation of classical swine fever virus antibody detection assays with an emphasis on the differentiation of infected from vaccinated animals [J]. *Revue Scientifique Et Technique*, 2012, 31(3): 997-1010.
- [6] 吕永智. 猪瘟 E2 亚单位疫苗研究进展[J]. *家畜生态学报*, 2017, 38(5): 86-90.
- Lv Y Z. Research progress of classical swine fever virus E2 subunit vaccine [J]. *Acta Ecologicae Animalis Domastici*, 2017, 38(5): 86-90.
- [7] 易琳,黎鑫,陈金顶,等. 猪瘟标记疫苗研究进展[J]. *中国猪业*, 2018, 13(11): 32-37.
- Yi L, Li X, Chen J D, *et al.* Research progress on classical swine fever marker vaccines [J]. *China Swine Industry*, 2018, 13(11): 32-37.
- [8] 颜仁和,刘蕾,王升尧,等. 基于哺乳动物细胞表达系统的猪瘟基因工程 E2 亚单位疫苗动物免疫效果评价[J]. *中国兽医学报*, 2020, 40(1): 38-41.
- Yan R H, Liu L, Wang S Y, *et al.* Immunological evaluation of a novel genetically engineering subunit vaccine against classical swine fever based on a mammalian expression cell system [J]. *Chinese Journal of Veterinary Science*, 2020, 40(1): 38-41.
- [9] Chen W, Wu X, Levasseur D N, *et al.* Lentiviral vector transduction of hematopoietic stem cells that mediate long-term reconstitution of lethally irradiated mice [J]. *Stem Cells*, 2000, 18(5): 352-359.
- [10] 李向茸,令瑛,徐雷,等. 白细胞介素-7 基因慢病毒表达载体的构建及在 CHO-K1 细胞中的稳定表达[J]. *中国生物制品学杂志*, 2017, 30(6): 571-576.
- Li X R, Ling Y, Xu L, *et al.* Construction of lentivirus vector for expression of interleukin-7 and its stable expression in CHO-K1 cells [J]. *Chinese Journal of Biologicals*, 2017, 30(6): 571-576.

(编辑:李文平)